



FI0000942888



**S U O M I - F I N L A N D**  
(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus**  
**Patent- och registerstyrelsen**

**(B) (11) KUULUTUSJULKAIKU  
UTLAGGNINGSSKRIFT**

**94088**

**(C) (15) Patentti myönnetty**

Patent meldelat 25.07.1995

**(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6**

**A 23J 3/00, 3/34**

(21) Patentihakemus - Patentansökan	921097
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	13.03.92
(24) Alkupäivä - Löpdag	13.03.92
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	14.09.93
(44) Nähtäväksipanoni ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlägd och uti.skriften publicerad	13.04.95

**(71) Hakija - Sökande**

1. Valio Oy, PL 390, 00101 Helsinki, (FI)

**(72) Keksijä - Uppfinnare**

1. Outinen, Marko Tapani, Servin Maijan tie 1 C 20, 02150 Espoo, (FI)

2. Tossavainen Olli, Koroistentie 7 A 10, 00280 Helsinki, (FI)

3. Harju, Matti, Harjutie 6 G 2, 03100 Nummela, (FI)

4. Linko, Pekka, Otakallio 2 B 16, 02150 Espoo, (FI)

**(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab**

**(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning**

**Menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista  
Förfarande för avlägsning av fenyylalanin ur proteinhaltiga sammansättningar**

**(56) Viitejulkaisut - Anfördta publikationer**

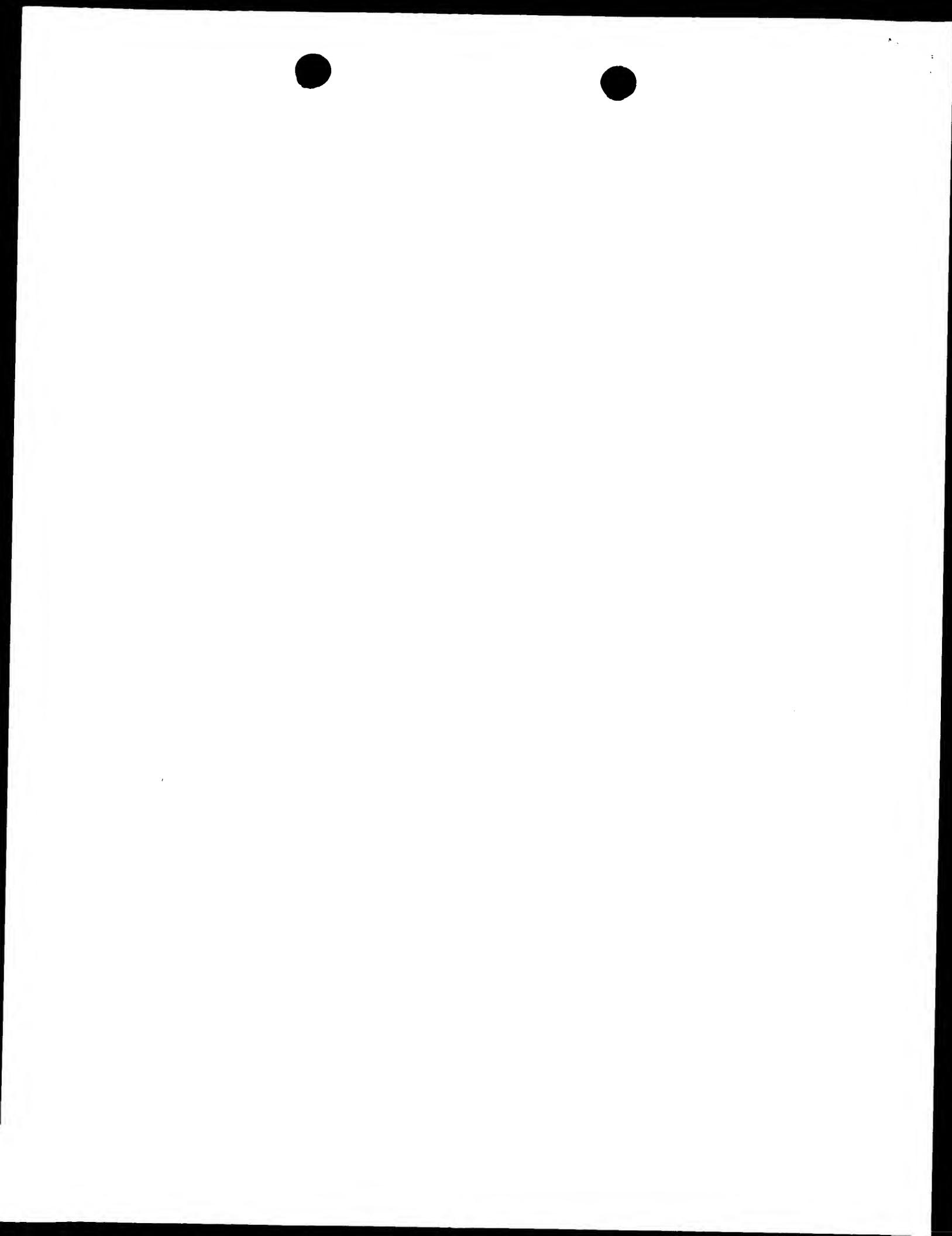
DD C 283256 (A 23J 3/04), DD C 147615 (A 23L 1/231), NO B 169935 (A 23J 1/20),  
NO B 151442 (A 23J 3/02), US A 4293571 (A 23J 3/00), US A 4016147 (C 07G 7/00),  
Chemical Abstracts, vol. 110 (1989) 227942x, Biotechnol. Bioeng. 1989, 33(10), p. 1324-1329,  
FSTA 77-02-G0095, Journal of Food science, vol. 41, nr 5, 1976, p. 1029-1035,  
FSTA 91-11-p0123, Journal of Food science, vol. 56, nr 4, 1991, p. 938-942,  
FSTA 89-12-g0031, Agricultural and Biological Chemistry, vol. 52, nr 12, p. 2989-2994

**(57) Tiivistelmä - Sammandrag**

Keksinnön kohteena on menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolloin proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsyymattisesti proteolyyttisellä entsymillä proteiinihydrolysaatiksi, näin saatu proteiinihydrolysaattia käsitellään adsorptionshartsilla pylvässä, jota eluoidaan vedellä, otetaan talteen jae, josta fenyylialaniini on poistettu, tarvittaessa näin talteenotetusta jakeesta poistetaan suolaja, ja lopuksi talteenotettu jae konsentroidaan ja haluttaessa kuivataan. Lisäksi eksinnön kohteena on näin saatu, hyvänmakuinen proteiinipitoisen koostumus, josta fenyylialaniini on poistettu joko kokonaan tai ainakin suurelta osin, sekä näin saadun proteiinipitoisen koostumuksen käytö erikoisravintovalmisteena tai sen komponenttina fenyylketonuriaptilaiden ravitsemuksessa.

Uppfinningen avser ett förfarande för avlägsning av fenyylalanin ur proteinhaltiga kompositioner, varvid proteinet i den proteinhaltiga kompositionen spjälks enzymatiskt medelst ett proteolytiskt enzym till ett proteinhydrolysat, det sålunda erhållna proteinhydrolysatet behandlas med ett adsorptionsharts i en kolonn, vilken elueras med vatten, och en fraktion, ur vilken fenyylalaninet avlägsnats, utvinns, varefter salter, ifall behövligt, avlägsnas ur den utvunna fraktionen och den utvunna fraktionen koncentreras slutligen och torras, ifall önskvärt.

Uppfinningen avser dessutom en på detta sätt erhållen, valsmakande, proteinhaltig komposition, ur vilken fenyylalaninet avlägsnats antingen helt och hållet eller till största delen, samt användningen av den på detta sätt erhållna proteinhaltiga kompositionen som ett speciellt näringsspreparat eller som komponent vid näringen av fenyylketonuripatienter.



Menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoinista koostumuksista

Keksinnön kohteena on menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoinista koostumuksista, jolloin saadaan hyvänmakuisia, ainakin lähes fenyylialaniinitömiä proteiinihydrolysaattikoostumuksia.

Saatu proteiinipitoinen koostumus, josta fenyylialaniini on poistettu joko kokonaan tai ainakin suurelta osin, sopii käytettäväksi erikoisravintovalmisteena tai sen komponenttina, erityisesti fenyylketonuriaa (PKU) sairastavien potilaiden ruokavaliossa.

Proteiinilähteen valinnalla ei voida vähentää fenyylialaniinin saantia ravinnosta, koska fenyylialaniinia on kaikissa eläin- ja kasviproteiineissa noin 4-6 %. PKU-potilaan onkin syytä välttää runsaasti proteiinia sisältäviä ruoka-aineita kuten kananmunaa, kalaa, lihaa ja juustoja. Muiden välttämättömien aminohappojen tarpeen tyydyttämiseksi potilaan tulisikin käyttää kliinisiä proteiinivalmisteita, joista fenyylialaniini on joko kokonaan tai osittain poistettu.

Fenyylketonuria on synnynnäinen sairaus, joka hoidattomana aiheuttaa jo muutaman viikon kuluttua syntymästä vakavia aivovaurioita ja usein myös kuoleman. Potilaalta puuttuu kyky tuottaa fenyylialaniinihydroksylaasia (EC 1. 14.16.1), joka muuttaa ravinnosta saatavan aminohapon, fenyylialaniinin tyrosiiniksi. Fenyylialaniinin ja sen pyruvaatti-, lakttaatti- ja asetaattijohdannaisten kertyminen vereen ja selkäydinnesteeseen aiheuttaa pakkoliikkeitä, anemiaa, ihon karhenemista ja lopulta aivovaurioita. Taudin voi todeta myös potilaan virtsan kohonneesta fenyyliaasetyyliglutamiinipitoinisuudesta, mistä tauti onkin saanut nimensä.

Yhdysvalloissa sekä suuressa osassa Eurooppaa yksi vastasyntynyt 11 000 - 15 000:sta sairastaa fenyyliketonuriaa. Irlannissa tauti on yleisempi, siellä yksi lapsi 4500:sta on PKU-potilas. Suomessa fenyyliketonuria on erittäin harvinainen eikä vastasyntyneiden taipumusta fenyyliketonuriaan tutkita. Maissa, joissa PKU:aa esiintyy, jokainen lapsi testataan 1-2 viikon kuluessa syntymästä seuraamalla veren fenyylialaniinipitoisuutta. Jos fenyylialaniinin määrä veressä kohoaa jatkuvasti, taudin hoitamisen on syytä aloittaa viimeistään kolmen viikon kuluttua syntymästä.

Tarkasti valvottu dieetti on toistaiseksi ainoa käytännöllinen hoitokeino. Kun ravinnosta saatavan fenyylialaniinin määrä pystytään pitämään tietyissä rajoissa, potilaan veren fenyylialaniinipitoisuus pysyy sallituissa rajoissa (20-40 mg/l). Fenyylialaniinin sietokyky kasvaa iän myötä, ja dieetti on yleensä voitu lopettaa noin 8 vuoden iässä. Uusimpien tutkimustulosten mukaan dieettiä pitäisi kuitenkin jatkaa pidempään, mikä asettaa entistä suurempia vaatimuksia erikoisravintovalmisteen maulle.

Taudin hoitoon valmistetaan aminohapposeoksia, joista puuttuu fenyylialaniini. Tällaisesta "PKU-proteiinista" tehdään vastasyntyneille maitoa lisäämällä proteiiniin tarvittavat muut komponentit, kuten rasva, vesi, laktosi yms.. PKU-proteiinista voidaan tehdä myös muita valmisteita korvaamalla elintarvikkeen valmistuksessa käytettävä proteiini fenyylialaniinittomalla aminohapposeoksella.

Tällainen kaupallinen valmiste on esimerkiksi PK AID III -niminen tuote (valmistaja Scientific Hospital Supplies, Englanti). Tällaiset oleellisesti vain vapaista aminohapoista koostuvat valmisteet maistuvat kitkeriltä ja ne saattavat aiheuttaa osmoottista ripulia. Lisäksi vapaat aminohapot imetyvät elimistöön huonommin kuin esimerkiksi di- ja tripeptidit.

Joitakin menetelmiä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiineista tai proteiinipitoisista koostumuksista jo tunnetaan. Vanhimmassa näistä tunnetuista menetelmistä proteiini ensin pilkotaan vapaaksi aminohapoiksi happohyd-  
5 rolyysillä, minkä jälkeen fenyylialaniini poistetaan seok-  
sesta aktiivihiilellä (ks. esim. DD-patenttijulkaisu  
283 256). Tämän tunnetun prosessin heikkoutena on kuiten-  
kin huono saanto, sillä yleensä vain korkeintaan 50 % ami-  
10 nohapoista saadaan talteen loppujen aminohappojen adsor-  
boituessa aktiivihiileen. Usein myös muut hydrofobiset  
aminohapot adsorboituvat lähes kokonaan aktiivihiileen,  
jolloin niitä on lisättävä jälkeenpäin tuotteeseen. Adsor-  
benttina käytettyä aktiivihiiltä ei myöskään kyötä regene-  
roimaan, joten menetelmä on erittäin kallis.

15 Fenyylialaniini on saatu poistetuksi proteiinin  
happohydrolysaatista myös vahvaa anioninvaihtohartsia  
käyttäen (US-patenttijulkaisu 4 384 136 ja GB-patenttijul-  
kaisu 2 103 221 A). Anioninvaihtohartsi ei kuitenkaan so-  
vella hyvin teolliseen tuotantoon, koska sen käyttö vaatii  
20 puskuriliuosten käyttöä.

25 Lopez-Bajoneron et al. esittivät julkaisussa J.  
Food Sci., 56(4) (1991) 938-942 menetelmän, jossa fenyylialaniinia poistettiin proteiinipitoisista koostumuksista.  
Tällöin rasvatonta maitojauhetta tai kaseinaattia hydroly-  
soitiin ensin *Aspergillus oryzae*-kannan tuottamalla protei-  
aasilla ja sen jälkeen papaiinilla. Hydrolysaattia käsi-  
teltiin proteiiniin nähden kolminkertaisella määräällä aktiivihiiltä, jolloin 92 % fenyylialaniinista poistui 50 %  
30 proteiinisaannolla.

35 Mockenberg et al. puolestaan esittivät julkaisussa Research in Food Science and Nutrition, 3 (1983) 3-4 menetelmän, jossa happohydrolyysi korvattiin kaksivaiheisella subtilisiini-Pronase -entsyymihydrolyysillä, jonka tarkoituksena oli vapauttaa C-terminaaliset aromaattiset aminohapot vapaaksi aminohapoiksi. Fenyylialaniini poistui kui-

tenkin kokonaan vasta 425 % aktiivihiilimäärellä, jolloin myös proteiinityypestä hävisi 50 %.

Japanissa ryhdyttiin 1970-luvun alussa tutkimaan mahdollisuksia tuottaa PKU-proteiinia entsymaattisin menetelmin. Tavoitteena oli parantaa makua sekä tehdä tuotesta "proteiinimaisempaa". Useita toimivia prosesseja onkin kehitetty laboratoriomittakaavassa [ks. Yamashita et al., J. Food Sci., 41 (1976) 1029-1032; Fujimaki et al., US-patentijulkaisu 4 016 147; Mowlah et al. Raportti, Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Japani (1985) 29-39; Arai et al., Agric. Biol. Chem., 50 (1986) 2929-2931; Owada et al., Advances in Neonatal Screening, Elsevier Science Publishers B.V., 1987, s. 205-208; Maeda et al., Agric. Biol. Chem., 51 (1987) 1501-1507]. Prosessien haittapuolia ovat kuitenkin kalliit erikoisentsyymit sekä geelisuodatuksen soveltuumattomuus tuotantomittakaavaan.

Em. menetelmiin sisältyvässä kaksivaiheisessa prosessissa käytetään ensin pepsiiniä, joka pilkkoo raaka-aineena käytetyn heraproteiinin spesifisesti niin, että fenyylialaniini jää peptidin karboksyylipäähän. Fenyylialaniini vapautetaan edelleen vapaaksi aminohapoksi karboksipeptidaasilla tai kaupallisella entsyymivalmisteella, joka sisältää karboksipeptidaasiaktiivisuutta (esim. subtilisiini, Pronase).

Em. menetelmiin sisältyvässä yksivaiheisessa proteiinin hydrolyysisissä puolestaan käytetään entsyyymiä, joka sisältää sekä endo- että eksopeptidaasiaktiivisuutta. Fenyylialaniini erotetaan seoksesta geelikromatografialla.

Tunnetut menetelmät fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista eivät toistaiseksi ole olleet tyydyttäviä teollista tuotantoa ajatellen. On siten jatkuvasti tarve teollisessa mitassa toimivasta, taloudellisesti aikaisempaa edullisemmasta ja tehokkaammasta menetelmästä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiineista tai :

proteiinipitoisista koostumuksista, jolla menetelmällä saataisiin myös aikaisempaa paremman makuista, oleellisesti fenyylialaniinitöntä proteiinituotetta.

5 Nyt on yllättäen keksitty tapa, jolla yllä esitetty ongelmat voidaan välttää ja samalla saadaan hyvällä saanolla fysiologisesti hyvälaatuista ja erinomaisen makuista PKU-proteiinihydrolysaattia.

10 Keksinnön mukaisella menetelmällä saadaan oleellisesti fenyylialaniinitöntä proteiinikoostumusta, joka sisältää runsaasti ravitsemuksellisesti arvokkaita di- ja tripeptidejä ja vain noin 25 paino-% vapaita aminohappoja. Tämä tuote on maultaan erinomainen eikä se maistu kitkeältä. Lisäksi se liukenee hyvin lämpimään veteen.

15 Lisäksi keksinnön mukainen menetelmä soveltuu hyvin teolliseen tuotantoon ja se koostuu yksinkertaisista yksikköprosesseista. Menetelmä on varsinaisesti kaksi-vaiheinen. Ensimmäisessä vaiheessa proteiinipitoinen koostumus hydrolysoidaan entsymaattisesti ja toisessa vaiheessa näin saattua proteiinihydrolysaattia käsitellään adsorptiohartsilla. Lisäksi tässä menetelmässä käytetty adsoptiohartsi voidaan regeneroida yksinkertaisesti elintarvike-teollisuudessa yleisesti käytettävällä lipeällä, jolloin hartsi on heti valmis uudelleenkäytettäväksi. Hartsin adsorptiokyvyyssä ei ole todettu heikentymistä useiden kymmenien hydrolysaattipanos-regenerointisyklien jälkeen.

20 .. 25 .. Keksinnön kohteena on siten menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että

30 : a) proteiinipitoinen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsymaattisesti proteolyyttisellä entsyymillä proteiinihydrolysaatiksi, jonka hydrolysoitumisaste on noin 30 - 60 %,

b) näin saatu proteiinihydrolysaatti ultrasuodattaan ja permeaatti otetaan talteen,

35 c) haluttaessa liuoksen pH:ta säädetään alueella 2 - 10 suolahapolla tai lipeällä,

d) näin saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h lämpötilassa 5 - 65 °C,

5 e) pylvästä eluoidaan vedellä lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h,

f) otetaan talteen jae, josta fenyylialaniini on poistettu,

10 g) tarvittaessa talteenotetusta jakeesta poistetaan suoloja, ja

h) lopuksi talteenotettu jae konsentroidaan kuivaaineepitoisuteen 70 - 80 paino-% ja haluttaessa kuivataan.

Kaikissa eläin- ja kasviproteiineissa on todettu olevan noin 4 - 6 paino-% fenyylialaniinia proteiinin kokonaismäärästä laskettuna.

15 Prosessin ensimmäisessä vaiheessa proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsymaattisesti proteolyyttisellä entsyymillä siten, että hydrolysoitumisaste on n. 30 - 60 %.

20 Käsiteltävä proteiinipitoinen koostumus voi olla mikä tahansa muitakin välttämättömiä aminohappoja kuin fenyylialaniinia sisältävä proteiinipitoinen koostumus, esimerkiksi heraproteiini tai soijaproteiinin konsentraatti. Heraproteiinissa proteiinipitoisuus voi vaihdella välillä 35 - 85 paino-%. Soijaproteiinin konsentraatin tyypillinen proteiinipitoisuus on noin 52 paino-%.

25 Lähtöaineen proteiinipitoisuus vaikuttaa tuotteen proteiinipitoisuteen. Koska on suotavaa, että tuote sisältää mahdollisimman paljon proteiinia, lähtöaineen proteiinipitoisuuden tulisi olla mahdollisimman korkea, suotavimmin yli 70 paino-%.

30 Proteolyyttisenä entsyyminä käytetään edullisesti pankreatiinia, jonka sopiva käyttömäärä on noin 3 paino-% proteiinin määrästä laskettuna.

35 Entsymaattisessa käsittelyssä fenyylialaniini vapautuu vapaaksi aminohapoiksi noin 70 - 90-%:isesti. Saa-

dun proteiinihydrolysaatin proteiinista n. 3,6 - 3,8 % on fenyylialaniinia.

Entsyamaattisen hydrolyysin jälkeen proteiinihydrolysaatti ultrasuodatetaan pilkkoutumattoman proteiinin ja suurimolekyylisten peptidien poistamiseksi ja permeaatti 5 otetaan talteen.

Talteenotettu permeaatti konsentroidaan hahduttamalla kuiva-aineepitoisuuteen 20 - 60 paino-%. Näin saatu konsentraatti voidaan johtaa suoraan jatkokäsittelyyn tai 10 sitä voidaan säilöä +5 °C:ssa ennen jatkokäsittelyä. Kuiva-aineepitoisuuden 20 - 60 paino-% omaava konsentraatti voidaan haluttaessa myös kuivata esimerkiksi sumutuskuvaimella ennen jatkokäsittelyä.

15 Ennen adsorptiohartsikäsittelyä proteiinihydrolysaattikonsentraatti tai -jauhe liuotetaan kuumaan veteen siten, että liuoksen kuiva-aineepitoisuudeksi tulee 20 - 30 paino-%.

20 Adsorptiohartsikäsittely voidaan suorittaa liuoksen pH:n ollessa 2 - 10, mutta edullisinta on käsitellä hartsilla neutraalia liuosta, jonka pH on 6,5 - 7,0. Tällöin ei tarvita pH-säätöä hydrolyysivaiheen jälkeen. Haluttaessa liuoksen pH:ta voidaan kuitenkin säätää elintarvikelaatuisella suolahapolla (HCl) tai lipeällä (NaOH).

25 Prosessin toisessa vaiheessa proteiinihydrolysaatti johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h. Adsorboitumisprosessi vaatii tietyn minimireaktioajan, jonka kokeellisesti on määritetty olevan riittävä, kun lineaarivirtaus ei ole suurempi kuin 1,3 m/h. Adsorptio paranee hieman tätä alemmania lineaarivirtausnopeuksia käytettäessä, mutta prosessiin kuluva aika vastaavasti pitenee, mikä nostaa kustannuksia.

30 35 Adsorptiohartsina käytetään edullisesti hydrofobista polystyreenirunkoista hartsia. Sopivia hartseja ovat mm. Amberlite XAD 4 ja Amberlite XAD 16, joita valmistaa Rohm & Haas (Ranska).

Hartsikäsittely voidaan yleensä suorittaa lämpötilassa 5 - 65 °C. Fenyylialaniini ja sitä sisältävät peptidit nimittäin adsorboituvat hartsiin pH:n ollessa 2 - 10 ja lämpötilan ollessa 5 - 65 °C. Edullisin hartsikäsittelylämpötila on noin 30 °C, jolloin liuoksen jäähdytykseen tai lämmitykseen ei tarvitse käyttää lisäenergiaa.

Näin käsiteltyä hartsilla täytettyä pylvästä eluoitaaan vedellä samalla virtausnopeudella, jolla proteiini-hydrolysaattia edellä johdettiin ko. pylvääseen. PKU-proteiini eluoituu pylvästä ennen fenyylialaniinia ja fenyylialaniinia sisältäviä peptidejä siten, että lähes fenyylialaniiniton jae saadaan eristetyksi. Kuvassa 1 on esitetty graafisesti fenyylialaniinin ja fenyylialaniinia sisältävien peptidien erottuminen proteiinihydrolysaatista adsorptiohartsipylvään avulla.

Tarvittaessa talteenotetusta, lähes fenyylialaniinittömästä jakeesta poistetaan suoloja, kuten ylimääräistä kloridia tai natriumia esimerkiksi elektrodialyysillä.

Lopuksi lähes fenyylialaniinitön tuote jaa konsentroidaan kuiva-aineepitoisuuteen 70 - 80 paino-%. Tuote jaa voidaan haluttaessa kuivata jauheeksi kylmä- tai sumutus-kuivauksella.

Fenyylialaniinin poistumisaste proteiinikooostumuksesta on n. 92 - 100 %. Täten menetelmällä voidaan valmistaa PKU-proteiinia, jonka fenyylialaniinipitoisuus on alhaisempi kuin aiemmin käytetyissä proteiinin hydrolyysiin perustuvissa menetelmissä (fenyylialaniinin poistumisaste 90 - 95 %). Prosessin kokonaisproteiinisaanto on 45 - 65 % sen mukaan, kuinka fenyylialaniiniton tuotteesta halutaan. Tiettyllä poistumisasteella saanto on joka tapauksessa parempi kuin kirjallisuudessa esitetyissä menetelmissä.

Menetelmä voidaan toteuttaa joko siten, että hartsikäsittely suoritetaan välittömästi hydrolysointivaiheen jälkeen tai siten, että hartsikäsittely suoritetaan myöhemmin.

Keksinnön mukaisen menetelmän edullisuutta lisää se, että käytetty adsorptiohartsi voidaan regeneroida 4 % lipeällä, minkä jälkeen hartsia voidaan käyttää uudelleen.

5 Keksinnön mukaisella menetelmällä saadun oleelli-  
seksi fenyylialaniinitömän proteiinituotteen aminohappo-  
profiili on vältämättömien aminohappojen osalta hyvä  
(taulukko 1). Ainaastaan tyrosiinin ja metioniinin lisäyk-  
set ovat vältämättömiä. Tuote sisältää runsaasti ravitse-  
10 muksellisesti arvokkaita di- ja tripeptidejä sekä n. 25 %  
vapaita aminohappoja. Tuotteen maku on markkinoilla ole-  
viin tuotteisiin verrattuna erinomainen. Lisäksi jauhe  
liukenee hyvin lämpimään veteen.

15 Keksinnön mukaisesti saatua proteiinipitoista  
koostumusta, josta fenyylialaniini on poistettu joko koko-  
naan tai ainakin suurelta osin, voidaan käyttää erikois-  
ravintovalmisteena tai erikoisravintovalmisten valmistuk-  
sessä.

Seuraavissa esimerkeissä kuvataan eksintöä yksi-  
tyiskohtaisemmin.

20 Esimerkki 1

25 Liuotettiin 100 kg 35 - 90 paino-% proteiinia si-  
sältävää heraproteiinikonsentraattia (Kuivamaito Oy, La-  
pinlahti) 1900 litraan lämmintä vettä (5 % liuos kuiva-  
aineen suhteen). Kuumennettiin jatkuvasti sekoittaen 20  
min 65 °C kontaminaatioiden eliminoimiseksi. Jäähytettiin  
30 50 °C:een ja pH säädettiin 8,5:een 5 M Ca(OH)<sub>2</sub>:lla. Lisät-  
tiin 3 paino-% pankreatiinia proteiinin määrästä lasket-  
tuna ja hydrolysoitiin 6 tuntia. pH:n annettiin laskeaa  
7,0:ään, missä se pidettiin 5 M Ca(OH)<sub>2</sub>:lla. Hydrolyysin  
jälkeen liuos pasteroitiin (95 °C, 5 min), jäähytettiin  
ja ultrasuodatettiin 40 °C:ssa cut-off 20 000 -kalvoilla.  
Permeaatti otettiin talteen ja konsentroitiin haittamalla n. 50 % kuiva-aineepitoisuuteen.

35 Konsentroitu proteiinihydrolysaatti kuivattiin jau-  
heksi sumutuskuivaamalla.

Esimerkki 2

Toimittiin kuten esimerkissä 1, mutta kuivaamisen sijasta 50 % kuiva-ainepitoisuuteen konsentroitua permeaattia säilöttiin 5 °C:ssa jatkotoimenpiteitä varten.

5 Prosessin kokonaissaanto oli parempi kuin esimerkissä 1 koska vältyttiin hydrolysaatin sumutuskuivaukseen liittyvältä hävikiltä.

Esimerkki 3

10 Liuotettiin 12,5 g esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 37,5 cm<sup>3</sup>:iin 80 - 90 °C vettä. Saadun proteiinihydrolysaattiliuoksen pH oli n. 6,5 - 7,0, jolloin pH-säätöä ei tässä vaiheessa tarvittu lainkaan. Liuos, joka sisälsi 25 paino-% kuiva-ainetta, josta noin 15 70 % oli proteiinia, pumpattiin 30 °C:ssa 180 cm<sup>3</sup> XAD-4 - adsorptiohartsipylyväseen tilavuusvirtausnopeudella 60 cm<sup>3</sup>/h, mikä vastasi lineaarivirtausnopeutta 0,3 m/h. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

20 Proteiinisaanto oli n. 50 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,5 %.

Esimerkki 4

25 Liuotettiin 7,5 g esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 30 cm<sup>3</sup>:iin 80 - 90 °C vettä. 20 % liuos (pH 6,5 - 7,0) pumpattiin 180 cm<sup>3</sup> XAD-16 -adsorptiohartsipylyväseen lineaarivirtausnopeudella 0,9 m/h lämpötilassa 30 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

30 Proteiinisaanto oli n. 50 % ja kuiva-ainesaanto n. 55 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,4 %.

Esimerkki 5

35 Toimittiin muuten samoin kuin esimerkissä 4, mutta lämpötila oli 65 °C. Lämpötilan nostaminen paransi hartsipylyvään mikrobiologista säilyvyyttä, mutta lisäsi energi-

kustannuksia sekä pienensi mahdollisesti hartsin elinikää. Tuotteen laatu ja saanto pysyivät ennallaan.

Esimerkki 6

Toimittiin muuten samoin kuin esimerkissä 4, mutta lämpötila oli 5 °C. Lämpötilan alentaminen paransi hartsipylväään mikrobiologista säilyvyyttä, mutta lisäsi energiakustannuksia. Tuotteen laatu ja saanto pysyivät ennallaan.

Esimerkki 7

Liuotettiin 2,1 kg esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 10,5 litraan 80 - 90 °C vettä. 10 20 % liuos (pH 6,5 - 7,0) pumpattiin 50 l XAD-16 -adsorptiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 1,3 m/h lämpötilassa 55 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syöttön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

20 Proteiinisaannolla 50 % fenyylialaniinia oli proteiinin määrästä n. 0,3 %, saannolla 45 % saatiin jae, joka ei sisältänyt lainkaan fenyylialaniinia. Tiedot tuotejaan (50 % proteiinisaannolla) koostumuksesta on esitetty taulukoissa 1 ja 2.

Taulukko 1: Esimerkin 7 mukaan tehdyn, sumutus-kuivatun PKU-proteiinihydrolysaatin aminohappokoostumus

	<u>Aminohappo</u>	<u>mg/g</u>	<u>%</u>
5	Asp	88,4	12,6
	Thr	49,41	7,0
	Ser	37,87	5,4
	Glu	156,38	22,3
10	Gly	11,01	1,6
	Ala	36,64	5,2
	Val	45,7	6,5
	Cys	12,07	1,7
	Met	12,63	1,8
15	Ile	31	4,4
	Leu	57,95	8,3
	Tyr	20,65	2,9
	Phe	2,37	0,3
	Lys	90,96	13,0
20	His	12,92	1,8
	Arg	18,36	2,6
	Pro	16,87	2,4
	Trp	+	+
25	Yhteensä	701,19	100

Taulukko 2: Esimerkin 7 mukaan tehdyn, sumutus-kuivatun PKU-proteiinihydrolysaatin koostumus

	Proteiini	66,0 %
5	Tuhka	6,0 %
	Vesi	4,4 %
	Laktoosi	12,1 %
	Natrium	12,7 g/kg proteiinia
10	Kalium	26,1 g/kg proteiinia
	Kalsium	5,8 g/kg proteiinia
	Kloridi	6,1 g/kg proteiinia
	Fosfori	3,2 g/kg proteiinia

15 Esimerkki 8

Mitattiin 4,2 kg esimerkin 2 mukaisesti tehtyä proteiinihydrolysaattikonsentraattia 6,3 kg:aan vettä. Saatu liuos, jonka kuiva-aineepitoisuus oli 20 paino-% ja pH 6,7, pumpattiin 50 l XAD-16 -adsorptiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 1,3 m/h lämpötilassa 55 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

20 Proteiinisaanto oli n. 50 % ja kuiva-ainesaanto n. 55 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,3 %. 25

Esimerkki 9

30 Liuotettiin 22 g esimerkin 1 mukaan tehtyä proteiinihydrolysaattijauhetta 88 cm<sup>3</sup>:iin 80 - 90 °C vettä. Liuoksen pH säädettiin 30 % HCl:llä pH 3,5:een ja liuos pumpattiin 180 cm<sup>3</sup> XAD-16 -adsorptiohartsipylvääseen lineaarivirtausnopeudella 0,9 m/h lämpötilassa 65 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

35 Proteiinisaanto oli n. 52 %. Tuotejakeen proteiinista oli fenyylialaniinia n. 0,1 %.

Ylimääräisen kloridin poistamiseksi tuoteliuos **elektrodialysoitiin**, minkä jälkeen se kuivattiin sumutus-kuivauksella.

Esimerkki 10

5 Toimittiin vastaavasti kuin esimerkissä 4, paitsi että liuoksen pH nostettiin 10,0:een 10 % NaOH:lla ennen hartsikäsittelyä. Voimakkaasti emäksisenä liuos ei tarvinnut voimakasta kuumennuskäsittelyä kirkastuakseen.

10 Proteiinisaanto oli n. 45 %. Tuoteliuoksessa fenyy-  
lialaniinia oli proteiinista 0,4 %.

Ylimääräinen natrium poistettiin liuoksesta elektrodialyysillä, minkä jälkeen liuos kuivattiin kylmäkuivauksella.

Esimerkki 11

15 Liuotettiin 104 g soijaproteiinijauhoa (52 % proteiinipitoisuus) 1400 cm<sup>3</sup>:iin vettä. Kuumennettiin 65 °C:ssä 20 min, minkä jälkeen jäähdytettiin 50 °C:een. pH säädettiin 5 M Ca(OH)<sub>2</sub>:lla 8,5:een. Lisättiin 1,62 g pankreatinia (3 % proteiinin määrästä). pH:n annettiin laskea 7,0-  
20 :aan, minkä jälkeen hydrolysoitiin pH 7,0:ssa 5 h. pH säädettiin hydrolyysin aikana 5 M Ca(OH)<sub>2</sub>:lla. Hydrolysaatti ultrasuodatettiin cut-off 10 000 -kalvolla, permeaatti otettiin talteen ja konsentroitiin kuiva-aineeltaan 20 %-iseksi.

25 Esimerkki 12

Mitattiin 38 cm<sup>3</sup> esimerkin 11 mukaisesti tehtyä proteiinihydrolysaattia. Liuoksen pH säädettiin 30 % HCl:llä arvoon 6,8 ja liuos pumpattiin 180 cm<sup>3</sup> XAD-16 -adsorptio-hartsipylyvääseen lineaarivirtausnopeudella 0,9 m/h lämpötilassa 65 °C. Proteiinihydrolysaattiliuospanoksen syötön jälkeen pylvästä eluoitiin vedellä samalla virtausnopeudella.

35 Proteiinisaanto oli n. 55 %, fenyylialaniinia 0,3 % proteiinista (taulukko 3). Tuote oli hyvän makuinen eikä lainkaan kitkerä.

Taulukko 3: Soijaproteiinin ja soijaproteiinista valmistetun PKU-proteiinin aminohappokoostumus (%)

		<u>Soijaproteiini (% proteiinista)</u>	<u>PKU-proteiini (% proteiinista)</u>
5	Asp	12,3	12,9
	Thr	4,2	4,3
	Ser	5,4	6,0
10	Glu	20,9	22,9
	Gly	4,5	3,7
	Ala	4,6	6,1
	Val	4,8	4,9
	Cys	1,1	0,3
15	Met	1,2	0,8
	Ile	4,7	2,5
	Leu	7,7	3,5
	Tyr	2,8	4,2
	Phe	5,0	0,3
20	Lys	6,6	10,3
	His	2,8	2,3
	Arg	6,8	11,1
	Pro	4,8	2,0
.. 25	Tot	100,0	100,0

Esimerkki 13

PK AID III:n, pankreatiinihydrolysaatin sekä hartsikäsitellyn pankreatiinihydrolysaatin makuvertailussa 30 testiin osallistujat (6 kpl) antoivat pisteytä 0-3 seuraavien asteikon mukaisesti:

- 0 = ei lainkaan kitkerä
- 1 = hieman kitkerä
- 2 = selvästi kitkerä
- 35 3 = erittäin kitkerä.

Patentihakemuksessa kuvatulla menetelmällä valmistetun PKU-proteiinin pisteiden keskiarvo oli 0,2, PK AID III:n 1,8 ja entsyyymikäsitellyn proteiinin 3,0. Kaikkien osallistujien mielestä patentihakemuksessa kuvatulla menetelmällä valmistettu PKU-proteiini oli selvästi vähiten kitkerä, viiden osallistujan mielestä ei lainkaan kitkerä.

## Patenttivaatimukset

1. Menetelmä fenyylialaniinin poistamiseksi proteiinipitoisista koostumuksista, tunnettua siitä,  
5 että

a) proteiinipitoisen koostumuksen sisältämä proteiini pilkotaan entsymaattisesti proteolyyttisellä entsyymillä proteiinihydrolysaatiksi, jonka hydrolysoitumisaste on noin 30 - 60 %,

10 b) näin saatu proteiinihydrolysaatti ultrasudataan ja permeaatti otetaan talteen,

c) haluttaessa liuoksen pH:ta säädetään alueella 2 - 10 suolahapolla tai lipeällä,

15 d) näin saatu proteiinihydrolysaatti johdetaan adsorptiohartsilla täytetyn pylvään läpi lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h, lämpötilassa 5 - 65 °C,

e) pylvästä eluoidaan vedellä lineaarivirtausnopeudella 0,1 - 1,3 m/h,

20 f) otetaan talteen jae, josta fenyylialaniini on poistettu,

g) tarvittaessa talteenotetusta jakeesta poistetaan suolaja, ja

25 h) lopuksi talteenotettu jae konsentroidaan kuiva-aineepitoisuuteen 70 - 80 paino-% ja haluttaessa kuivataan.

.. 25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettua siitä, että proteiinipitoisen koostumus on heraproteiinia tai soijaproteiinia.

30 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, tunnettua siitä, että proteolyyttinen entsyymi on pankreatiini.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, tunnettua siitä, että pankreatiinia käytetään noin 3 paino-% proteiinin määrästä laskettuna.

35 5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, tunnettua siitä, että vaiheessa b) tal-

teenotettu permeaatti konsentroidaan ja kuivataan edullisesti sumutuskuvauksella jauheeksi, joka ennen jatkokäsittelyä liuotetaan kuumaan veteen.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 5 mukainen me-  
5 netelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsina käytetään hydrofobista polystyreenirunkoista hartsia.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen me-  
netelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorptiohartsilla  
10 täytetyn pylvään läpi johdetaan proteiinihydrolysaatti-  
liuosta, jonka pH on 6,5 - 7,0.

8. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 7 mukainen me-  
netelmä, t u n n e t t u siitä, että hartsikäsittelyläm-  
pötila on noin 30 °C.

## Patentkrav

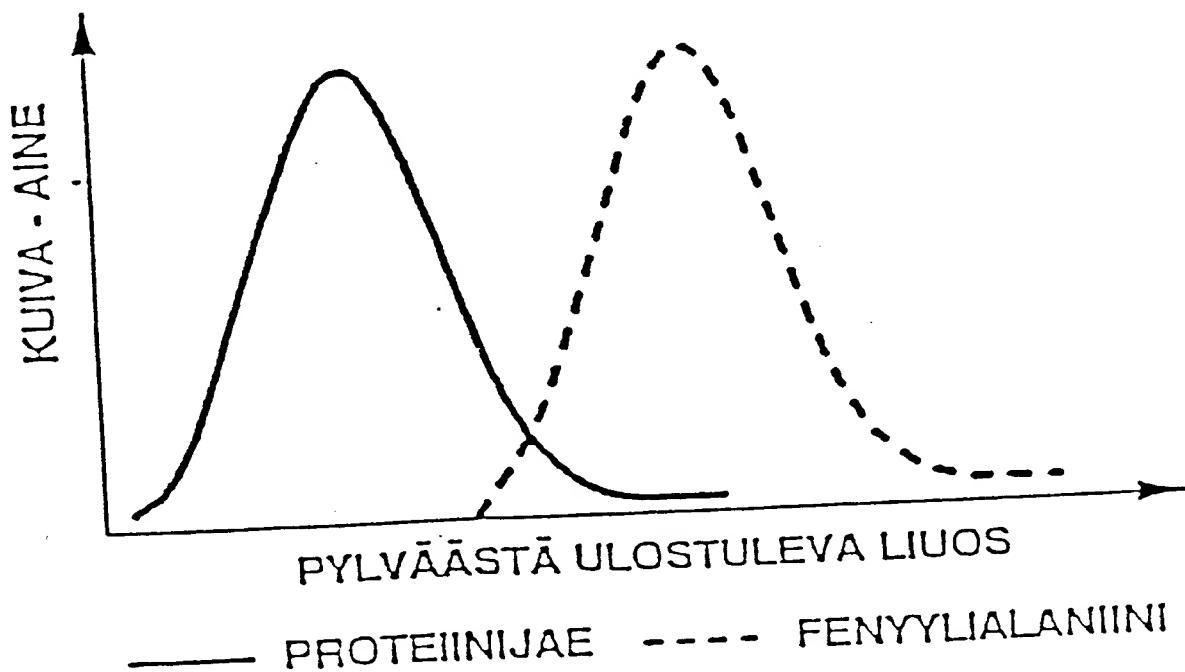
1. Förfarande för avlägsning av fenyłalanin ur proteinhaltiga sammansättningar, känteccknat därav att
  - a) proteinet i den proteinhaltiga sammansättningen spjälks enzymatiskt med hjälp av ett proteolytiskt enzym till ett proteinhydrolysat med en hydrolyseringsgrad av ca 30 - 60 %,
  - b) det så erhållna proteinhydrolysatet ultrafiltreras och ett permeat tillvaratas,
  - c) lösningens pH regleras, om så önskas, inom området 2 - 10 med hjälp av saltsyra eller lut,
  - d) det så erhållna proteinhydrolysatet passeras genom en med adsorptionsharts fyllt kolonn vid ett lineärt flöde av 0,1 - 1,3 m/h vid en temperatur av 5 - 65 °C,
  - e) kolonnen elueras med vatten vid ett lineärt flöde av 0,1 - 1,3 m/h,
  - f) en fraktion, ur vilken fenyłalanin avlägsnats, tillvaratas,
  - g) salter avlägsnas vid behov ur den tillvaratagna fraktionen, och
  - h) den tillvaratagna fraktionen koncentreras till slut till en torrämneshalt på 70 - 80 vikt-% och torkas om så önskas.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, känteccknat därav att den proteinhaltiga sammansättningen är vassleprotein eller sojaprotein.
3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, känteccknat därav att det proteolytiska enzymet är pankreatin.
4. Förfarande enligt patentkrav 3, känteccknat därav att pankreatin används i en mängd av ca 3 vikt-% av proteinets mängd.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4,  
k ä n n e t e c k n a t därav att det i steg b) tillvara-  
tagna permeatet koncentreras och torkas, företrädesvis  
genom spraytorkning, till ett pulver, som före fortsatt  
behandling upplöses i hett vatten.

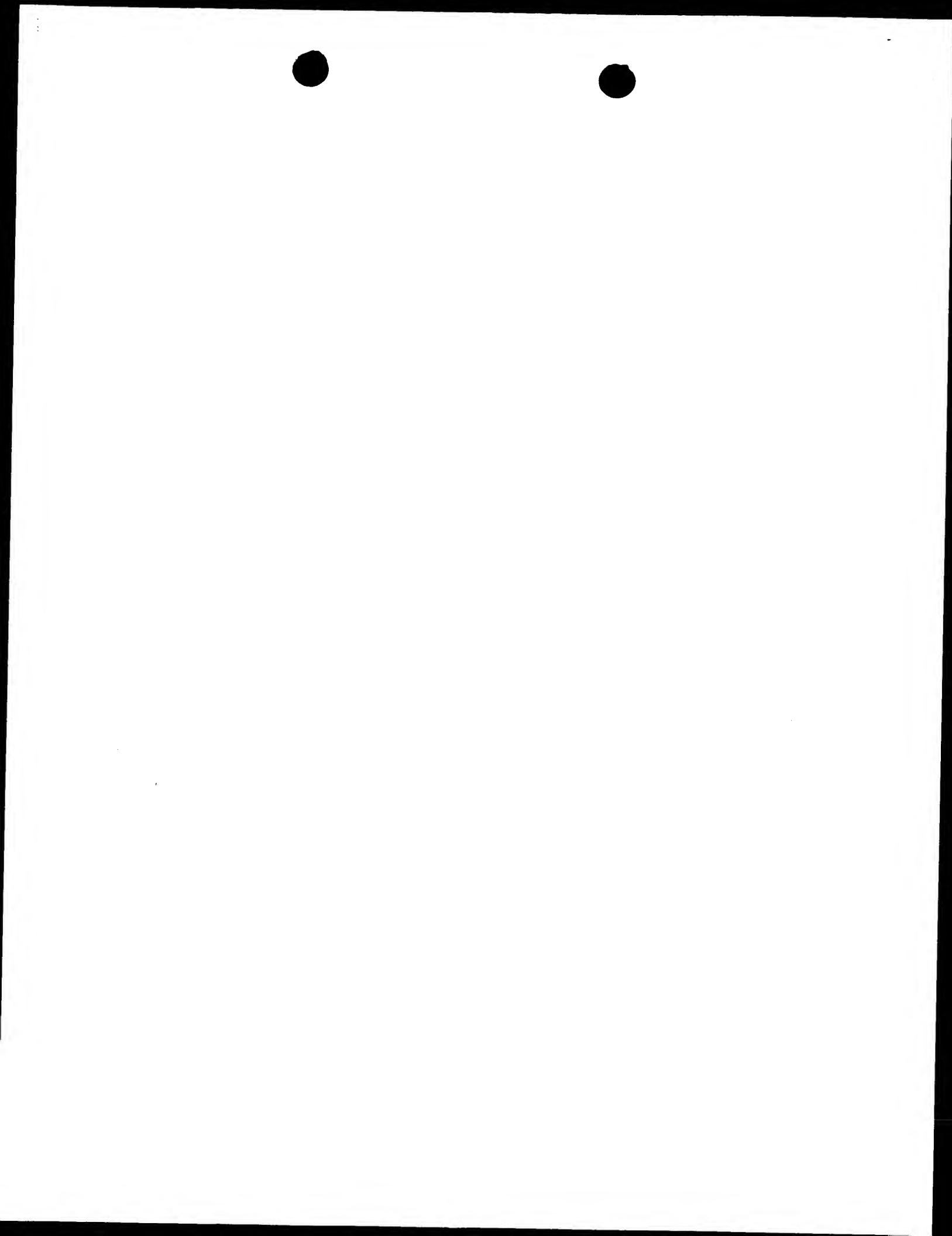
6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 5,  
k ä n n e t e c k n a t därav att som adsorptionsharts  
används ett hydrofobt harts med polystyrenstomme.

10 7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6,  
k ä n n e t e c k n a t därav att genom den med adsorp-  
tionsharts fyllda kolonnen passeras en proteinhydrolysat-  
lösning med ett pH av 6,5 - 7,0.

15 8. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 7,  
k ä n n e t e c k n a t därav att hartsbehandlingstempe-  
raturen är ca 30 °C.



Kuva 1. Proteiinijakeen erottuminen fenyylialaniinista sekä fenyylialaniinia sisältävistä peptideistä hartsipylväästä eluoituvassa liuoksessa.



### Kolster Cy ab

Tao Robertinkatu 23

2000 Helsinki

04-03-1980

04-03-1980

04-03-1980

## MASTER OF ARTS

Patentihakemus nro: 982114 / MI  
Lukkka: A 23L  
Hakija: Valio Oy  
Asiamies: Kolster Oy Ab  
Asiainalainen viite: 2980445FI

02.09.99

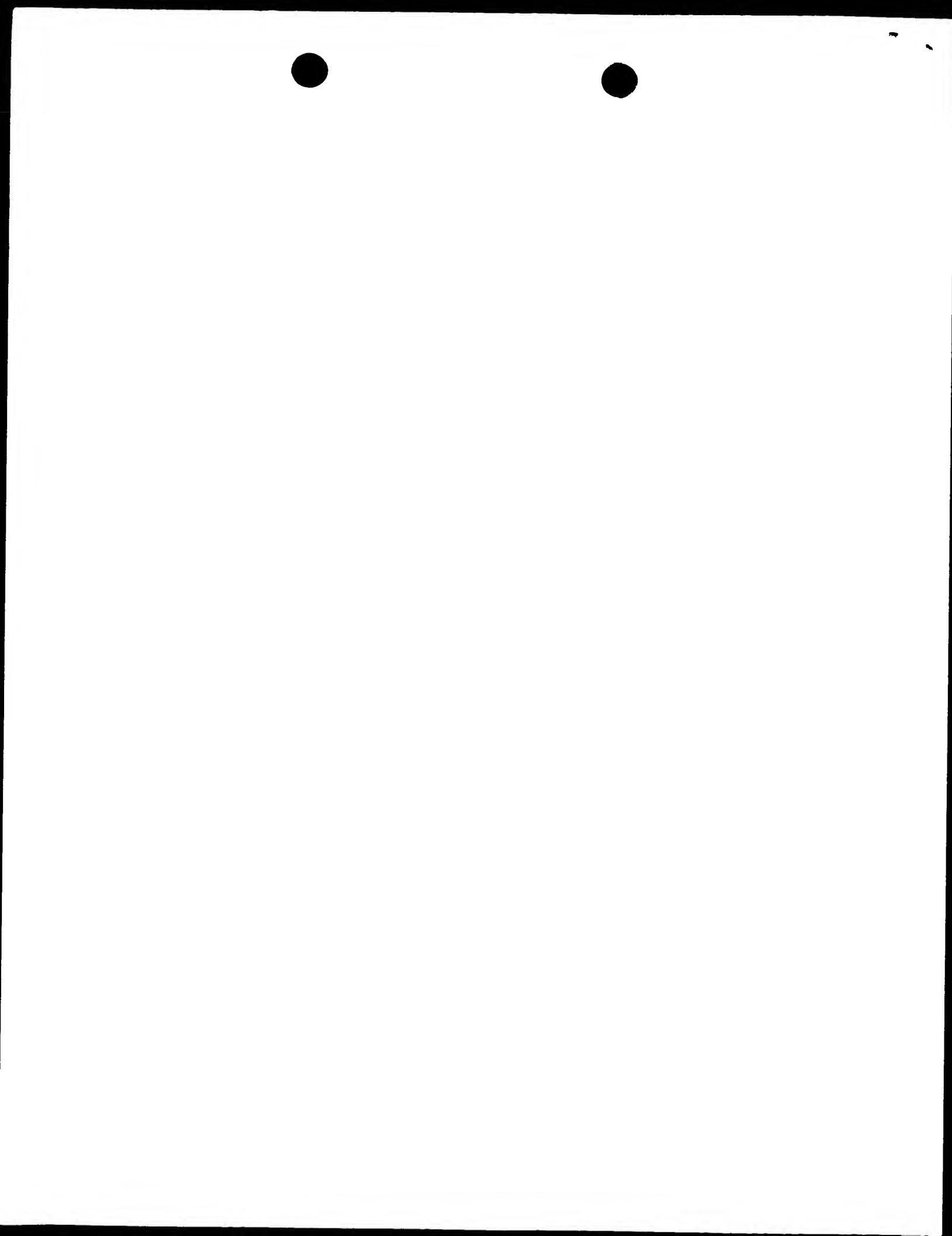
See vahende ei ole valemise ja lõpetamise eest määratletud, kuid on määratletud mõiste "vahende" ja "valemise ja lõpetamise eest määratletud" mõistesse.

Patenttiohjelmien edellytyksienä on, että keksintö on uusi ja ercoa olennaisesti ennestään tunnetusta tekniikasta (PI 2 §). Hakemus ei ole hyväksytävissä nykyisten patenttivaatimusten esittämässä muidossa, koska patenttivaatimukset eivät osittain ole uusia eivärke toisaalta ole viittävän täsmällisiä (PI 3 § 1 koh.).

Patenttivaatimus 1 kohdistuu menetelmään naudan insuliinin poistamiseksi lehmänmaidosta peräisin olevasta nestemäisestä rasvattomasta proteiinipitoisesta materiaalista saattamalla materiaali kosketukseen adsorptiochartsin kanssa. Hakemukseissa on myös itseenäiset patenttivaatimukset 10 - 12, jotka kohdistuvat menetelmällä saatun proteiinipitoiseen materiaaliin, sen käyttöön sekä menetelmään ravinteovalmisteiden valmistamiseksi, joissa proteiiniosana käytetään kysseistä materiaalia.

Kuten hakemuksen selitysosassa on mainittu, tunnetaan hakijan aikaisemmassa suomalaisesta patenttihakemuksesta FI A 971872 (A23 J 1 20, hak.pv. 30.4.97, julk. 31.10.98) naudan insuliinin poistaminen lehmänmaidosta peräisin olevasta rasvatto- mastasta maidosta käyttääen kationinvaihtoa ja mahdollisesti sen jälkeen hydrolyysia ja kromatografiakäsittelyä, esim. adsorptiohartsikäsittelyä. Hakemuksesta FI 971872 on tullut tunnetuksi myös yleisesti lehmänmaidosta peräisin olevaa proteiinikostuumia, joka ei oleellisesti sisällä naudan insuliinia, samoin kuin sen käyttö äidinmaidon korvikkeen tai muun erityisravinteiden proteiinilisära sekä vastaavasti tallia- sei tuotteet ja niiden valmistus.

Hakemuksessanne nyt esitetty menetelmä eroaa aikaisemmassa hakemuksessa esitetystä ja on siihen nähdyn periaatteessa patentoitavissa. Tuotteeseen ja käyttöön kohdistuva vaatimus 10 - 12 ei voida hyväksyä, koska ne eivät ole uusia hakemuksesta FI 971970 ilmenevään nähdyn. Myös silläkin, kun tucte on valmistettu menetelmän avulla, tucteen tulee olla uusi. Koska aikaisemmassa hakemuksesta FI 971970 tunnetaan yleistä vastaavankainen proteiinikostumus ja sen käytös samoihin tarkoituksiin, ei se sitä vastaan ole hyväksytty. Käytössä olevan hakemuksen tuotteeseen ja käyttöön liittyviä vaatimuksia 10 - 12, käsillä olevan hakemuksen tuotteeseen ja käyttöön liittyviä vaatimuksia 10 - 12, välttääkseen ne on määriteltävä patentoitavissa olevan valmistusmenetelmän avulla, voida hyväksyä puuttuvan uutuuden vuoksi (21 2 § 2 mom 4. virke).



Adsorptiochartsikäsittelyä on lisäksi mm. suomalaisten patenttijulkaisujen FI C 4\_089 (A23 J 3/00) ja FI C 94\_088 (A23 J 3/00) mukaan käytetty aikaisemmin lehmämaidosta peräisin olevan proteiinipitoisen materiaalin käsittelyyn. Näissä menetelmissä tosin ennen adsorptiokäsittelyä suoritetaan proteiinimateriaalin entsyymiaattinen hydrolysi. Lehmämaidosta peräisin olevan proteiinipitoisen materiaalin käsittelyä adsorptiochartsilla on kuvattu myös mm. hakemusjulkaisussa EP\_A1\_284\_525 (A23 J 1/26).

Insuliinin poistamismenetelmään kohdistuva itsenäinen vaatimus 1 on nykyisessä muodossaan epätäsmällinen (PI 8 § 2 mom.). Siinä tulisi täsmällisemmin esittää, millä tavalla haluttu vaikutus eli naudan insuliinin poistaminen saavutetaan. Hakemukseessa ei ole riittäviä perusteluja sille, että pelkästään proteiinipitoisen materiaalin saattaminen kosketukseen minkä tahansa adsorptiochartsin kanssa vaatimuksesta 1 hyvin laajasti määritellyissä olosuhteissa, saisi aikaan tarkoitetun vaikutuksen. Menetelmän täsmennämiseksi ja selväksi erottamiseksi tunnetusta tekniikasta, tulee siis vaatimusta 1 täsmennää ainakin käytetyn adsorptiochartsin ja käytettävien olosuhteiden osalta. Täsmennysissä tulee ottaa huomioon, että niiden tulee perustua hakemukseen perusasiakirjaan (PA 19 §).

Liitteet: tutkimusraportti ja viitejulkaisujen kopiot

*Marja Tamminen*

Tutkijainsinööri  
Puhelin: (09) 69395679

Marja Tamminen

Lausumanne huomautusten johdosta on annettava viimeistään yliämainitusta määripäivänä. Jollotte ole annanut lausumanne virastoon viimeistään määripäivänä tai ryhdytty toimenpiteisiin tässä välipäätöksessä esitettijen puutteellisuuksien korjaamiseksi. Jätetään hakemus siihensä patenttilain 19 §. Sillensä jätetty hakemus otetaan uudelleen käsittelyäksi, jos te neljän kuukauden kulussa määripäivästä annatte lausumanne tai ryhdytte toimenpiteisiin esitettijen puutteellisuuksien korjaamiseksi ja samassa ajassa suoritatte vahvistetun maksun, 320 mk hakemukseen ottamisesta uudelleen käsittelyäksi. Jos lausumanne on annettu virastoon oikeassa ajassa, mutta esitettijä puutteellisuuksia ei ole sitten korjattu, ettei hakemus voitaisiin hyväksyä, se hyväksää, mikäli virastolla ei ole aihetta antaa teille vähän välipäätöstä patenttilain 19 §. Josi keksimmin selitys, siinä tiedyt lisäykset ja uudet patenttivastimukset on aina jätettävä kahdena kappaleena ja tällöin on otettava huomioon patenttiasetuksen 19 §.



PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
982114	A23 J 1/20, 3/08, A23 C 9/14

TUTKITTU AINEISTO	
<b>Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat</b> A23 J 1/20, 3/00, 3/08, A23 C 9/14 - 9/148	
<b>Tiedonhakuja</b> Patenttitietokannoista: EPODOC (Euroopan patenttiviraston julkaisukokoelma, 1970-), WPI (World Patents Index, Derwent, 1974-), PAJ (Patent Abstracts of Japan, 1975-) Muista tietokannoista: FSTA (Food Science and Technol. Abstracts, 1969-), CAPLUS (Chemical Abstracts, 1969-), MEDLINE (1966-), BIOSIS (1969-)	

VIITEJULKAISET		
Kategoria*	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
X	FI A 971872 (A23 J 1/20, julk. 31.10.98, PL 2 § 2 mom 4.virke)	10 - 12
A	FI C 94 089 (A23 J 3/00)	1 - 9
A	FI C 94 088 (A23 J 3/00)	1 - 9
A	EP A1 284 525 (A23 J 1/20)	1 - 9

\*) X Patenttivuuden kannalta merkitävä julkaisu yksinään tarkasteltuna  
 Y Patenttivuuden kannalta merkitävä julkaisu, kun otetaan huomioon tama  
 ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu  
 A Yleistä teknikan tasoa edustava julkaisu, ei kuuleneen patenttivuuden este

Päiväys 23.1.1999	Tutkija Marja Tämminen
----------------------	---------------------------

